

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

550671

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年10月7日 (07.10.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/085629 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 1/21, 9/04, 15/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004074

(22) 国際出願日: 2004年3月24日 (24.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-082739 2003年3月25日 (25.03.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP). ユニチカ株式会社 (UNITIKA LTD.) [JP/JP]; 〒6600824 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地 Hyogo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 山岡秀亮 (YAMAOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 星島光博 (HOSHIJIMA, Mitsuhiro)

[JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 川瀬至道 (KAWASE, Shido) [JP/JP]; 〒6110021 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社 中央研究所内 Kyoto (JP). 黒坂啓介 (KUROSAKA, Keisuke) [JP/JP]; 〒6110021 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社 中央研究所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 川口嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).

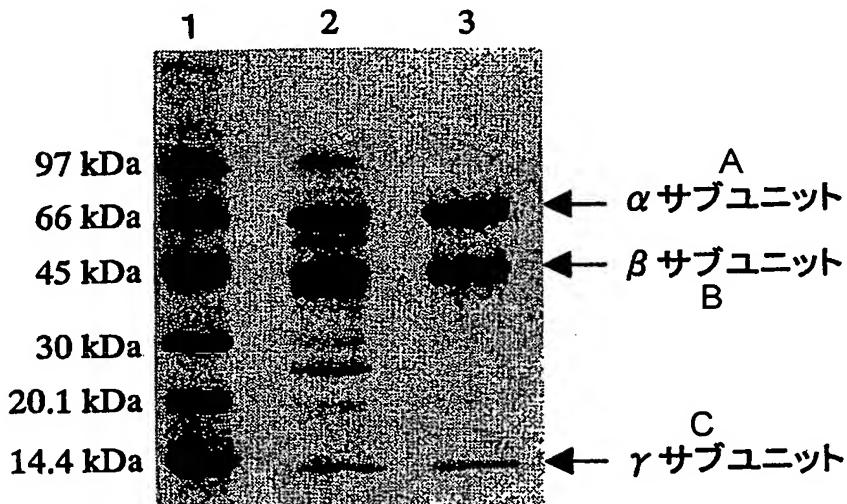
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL)

/統葉有/

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54)発明の名称: グルコース脱水素酵素の製造法



A...α-SUBUNIT
B...β-SUBUNIT
C...γ-SUBUNIT

(57) Abstract: A process for producing a glucose dehydrogenase complex comprising culturing a bacterium belonging to the genus *Escherichia*, which has DNAs encoding respectively the α -subunit and the β -subunit of glucose dehydrogenase of *Burkholderia cepacia* having been transferred thereinto in a manner allowing expression and in which the expression of the ccm (cytochrome C maturation) system is enhanced, to thereby express the above DNAs, thus allowing the production of a glucose dehydrogenase complex and then collecting the same.

(57) 要約: ブルクホルデリア・セバシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、ccm系(cytochrome C maturation system)の発現が増強されたエシェリヒア属細菌を培養して、前記DNAを発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を製造する。

WO 2004/085629 A1



SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

- 国際調査報告書

明細書

グルコース脱水素酵素の製造法

技術分野

本発明は、ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) のグルコース脱水素酵素複合体を大量発現するエシェリヒア属細菌、及び酵素複合体の製造方法に関する。グルコース脱水素酵素は、酵素電極を用いたグルコースセンサ等に有用である。

背景技術

グルコース脱水素酵素として、ブルクホルデリア属の微生物（ブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) KS 1株）が产生する酵素が知られている。同酵素は、触媒サブユニットである α サブユニット、チトクロームCである β サブユニット、及び γ サブユニットからなる複合体であり、熱安定性が高く、反応に溶存酸素の影響を受けにくい等の優れた性質を有している。同酵素の α サブユニット及び γ サブユニットをコードするDNAが単離され、 β サブユニットをコードするDNAの一部も単離された。また、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) での発現に成功している（以上、国際公開第02/36779号パンフレット参照）。しかしながら、発現されたGDHは β サブユニットを持たないものと考えられる。

ところで、エシェリヒア・コリのチトクローム成熟系として、ccm系 (cytochrome C maturation system) が知られている。ccm系は、エシェリヒア・コリにおいて、嫌気下、かつ、特殊な条件下で発現することが知られている (J. Bacteriol. 177, 4321-4326 (1995))。ccm系をコードするオペロン (ccm ABCDEFGH) のDNA配列は既に明らかになっている (Nature 409 (6819), 529-533 (2001)、GeneBank database accession U0008 (1993))。さらに、ccm系を発現するプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリにおいて、異種生物由来の共有結合型マルチヘムチトクロームを好気下で発現、生産させたことが報告されている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 744-7 (1998)、

Biochim. Biophys. Acta, 1411, 114-20 (1999)、Biochim. Biophys. Acta, 1481, 18-24 (2000)、Protein Sci 9, 2074-84 (2000))。

また、*c c m*オペロンを含むプラスミドとして、同オペロンを pACYC184 に挿入して得られたプラスミド pEC86 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 744-7 (1998)) が知られている。

発明の開示

本発明者らは、エシェリヒア・コリにおいて、前記グルコース脱水素酵素の α サブユニットのみを発現させた場合に比べて、 α サブユニットと β サブユニットを同時に発現させた場合はその効率が低いことを見出している。本発明は、 α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させる手段を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために銳意検討を行った結果、エシェリヒア属細菌において、ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素複合体をコードするDNAの発現が、同細菌の *c c m* 系の発現を増強することによって高めることができることを見出し、本発明を完成するに到った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、*c c m* 系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌。

(2) α サブユニットをコードするDNAが β サブユニットをコードするDNAの上流に位置し、单一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御される
(1) に記載のエシェリヒア属細菌。

(3) さらに、前記グルコース脱水素酵素の γ サブユニットをコードするDNAが発現可能な形態で導入された(1)に記載のエシェリヒア属細菌。

(4) γ サブユニットをコードするDNAが α サブユニットをコードするDNAの上流に位置する(3)に記載のエシェリヒア属細菌。

(5) 前記エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリである(1)～(4)のいずれかに記載のエシェリヒア属細菌。

(6) (1)～(5)のいずれかに記載のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAを発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

図面の簡単な説明

図1は、ブルクホルデリア・セバシアKS1株及びエシェリヒア・コリJM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccmから精製されたGDH複合体のSDS-PAGEの結果を示す図（写真）。

レーン1：マーカー

レーン2：KS1株から精製したGDH

レーン3：JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccmから精製したGDH

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のエシェリヒア属細菌は、ブルクホルデリア・セバシアのグルコース脱水素酵素（以下、単に「GDH」ともいう）の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNA（以下、各々「 α サブユニット遺伝子」及び「 β サブユニット遺伝子」ということがある）が発現可能な形態で導入され、かつ、ccm系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌である。

前記エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリが挙げられる。

また、前記ブルクホルデリア・セバシアとしては、KS1株、JCM2800株、JCM2801株、又はJ2315株等が挙げられる。KS1株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受託番号FERM BP-7306として寄託されている。JCM2800株又はJCM2801株は、理化学研究所微生物系統保存施設（Japan Collection of Microorganisms, JCM）から入手することができる。また、J2315株は、American Type Culture Collection (ATCC) にATCC番号BAA-245として、The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-

o-organisms (BCCMTM) に菌株番号LNG 16656として寄託されており、これらから入手することができる。

K S 1 株のGDH α サブユニット遺伝子、及び β サブユニット遺伝子の一部を含む染色体DNA断片の塩基配列を配列番号1に示す (WO 02/36779号パンフレット参照)。この塩基配列には3つのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、5'末端側から2番目及び3番目のORFは、それぞれ α サブユニット (配列番号3)、及び β サブユニット (配列番号4) をコードしている。また、1番目のORFは γ サブユニット (配列番号2) をコードしていると推定される。また、配列番号9に、 β サブユニット遺伝子全長を含む断片の塩基配列を示す。さらに、 β サブユニットのアミノ酸配列を配列番号10に示す。配列番号10において、アミノ酸番号1~22はシグナルペプチドであると推定される。尚、配列番号9及び10において、第1番目のアミノ酸残基はValと記載されているが、Metである可能性が高く、また、翻訳後に脱落している可能性がある。

本発明に用いる α サブユニット遺伝子は、配列番号3に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子に限られず、コードされるポリペプチドがGDH活性を有する限り、配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってもよい。尚、配列番号3には、配列番号1の塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を示してあるが、N末端のメチオニン残基は、翻訳後に脱落している可能性がある。前記「1又は複数」とは、好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個、特に好ましくは1~3個である。

また、 β サブユニット遺伝子は、GDHの β サブユニットとして機能し得る限り、配列番号10のアミノ酸番号23~425からなるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってもよい。前記「1又は複数」とは、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、特に好ましくは1~5個である。尚、GDHの β サブユニットとして機能するとは、GDHの酵素活性を損なわずにチトクロームCとして機能することをいう。

α サブユニット遺伝子として具体的には、配列番号1の塩基番号764～2380からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また、 α サブユニット遺伝子は、配列番号1の塩基配列の塩基番号764～2380からなる塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

また、 β サブユニット遺伝子として具体的には、配列番号9の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また β サブユニット遺伝子は、配列番号9の塩基番号187～1398からなる塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 β サブユニットとして機能し得るタンパク質をコードするDNAであってもよい。

前記ストリンジエントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1×SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子は、例えば、ブルクホルデリア・セバシアKS1株の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。PCR用プライマーは、前記の塩基配列に基づいて化学合成することによって調製することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、ブルクホルデリア・セバシアKS1株の染色体DNAから取得することもできる。また、ブルクホルデリア・セバシアの他の菌株からも、同様にしてバリエントを取得することができる。

本発明においては、 α サブユニット遺伝子は β サブユニット遺伝子の上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御されることが好ましい。また、 α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子とともに、 γ サブユニットをコードするDNA（ γ サブユニット遺伝子）が発現可能な形態でエシェリヒア属細菌に導入されることが好ましい。その際、 γ サブユニット遺伝子は、 α サブユニット遺伝子の上流に位置し、単一のプロモーターによって各サブユニット遺伝子の発現が制御されることが好ましい。

γサブユニット、αサブユニット及びβサブユニットをこの順にコードするポリリストロニックなDNA断片は、例えば、ブルクホルデリア・セパシアKS1株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号12、13の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRによって取得することができる（後記実施例参照）。

αサブユニット遺伝子及びβサブユニット遺伝子（必要に応じてγサブユニット遺伝子）を含むDNA（以下、「GDH $\alpha\beta$ 遺伝子」という）を発現可能な形態でエシェリヒア属細菌に導入するには、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子をエシェリヒア属細菌で機能するベクターに挿入し、得られた組換えベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換すればよい。その際、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子の上流にエシェリヒア属細菌で機能するプロモーターを配置することによって、同プロモーターの制御下でGDH $\alpha\beta$ 遺伝子を発現させることができる。

前記エシェリヒア属細菌で機能するベクターとしては、例えば、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pACYC184、pBBR122等が挙げられる。また、前記プロモーターとしては、例えばlac、trp、tac、trc、P_L、tet、PhoA等が挙げられる。また、プロモーターを含む発現ベクターの適当な部位に、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子を挿入することによって、同遺伝子のベクターへの挿入とプロモーターの連結とを同じ工程で行うことができる。このような発現ベクターとしては、pTrc99A、pBluescript、pKK223-3等が挙げられる。

また、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子は、発現可能な形態でエシェリヒア属細菌の染色体DNA中に組み込まれてもよい。

組換えベクターでエシェリヒア属細菌を形質転換するには、例えばカルシウム処理によるコンピテントセル法又はエレクトロポレーション法等が挙げられる。

本発明のエシェリヒア属細菌は、上記のようにしてGDH $\alpha\beta$ 遺伝子が導入され、かつ、ccm系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌である。

ccm系は、ccmオペロン(ccmABCDEF GH)によってコードされている。ccmオペロンは、例えば、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鑄型とするPCRによって、取得することができる。PCR用プライマーは、報告されている塩基配列(DDBJ/EMBL/GenBank ACCESSION AE005452)に基づいて合成すること

によって調製することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、エシェリヒア・コリの染色体DNAから取得することもできる。また、他のエシェリヒア属細菌からも、同様にしてバリエントを取得することができる。

c cmオペロンとしては、前記の報告されている塩基配列を有するDNAの他、同塩基配列を有するDNA、又はこの配列から調製され得るプローブとストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、c cm系をとして機能する酵素群をコードするDNAであってもよい。

c cm系は、嫌気下、かつ、特殊な条件下で発現することが知られている（非特許文献1）。本発明において、「c cm系の発現が増強された」とは、エシェリヒア属細菌の野生株又は非変異株よりも発現量が高められたか、又は、嫌気下、かつ、特殊な条件下でなくても発現するように改変されたことをいう。嫌気下、かつ、特殊な条件下ではない条件としては、好気性条件下が挙げられる。

c cm系の発現を増強するには、c cmオペロンの各遺伝子を、構成的に発現するプロモーター、又は発現制御が可能なプロモーターに連結し、得られた組換え遺伝子をエシェリヒア属細菌に導入すればよい。好適なプロモーター及びベクター、並びにエシェリヒア属細菌へのc cmオペロンの導入は、前記GDH $\alpha\beta$ 遺伝子について記載したのと同様である。

c cmオペロンを含むプラスミドとして、同オペロンがpACYC184に挿入して得られたpEC86が挙げられる。同オペロンは、tetプロモーターの制御下で構成的に発現する。また、エシェリヒア属細菌の染色体DNA上のc cmオペロンをPCR等によりクローニングし、適当なプロモーターの支配下に挿入したプラスミドを作製することもできる。

また、エシェリヒア属細菌の染色体DNA上のc cmオペロンのプロモーターを、適当なプロモーターに置換することによっても、同オペロンの発現を増強することができる。

本発明のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子を発現させ、これらの発現産物としてGDH酵素複合体を産生させ、これを採取することにより、GDH複合体を効率よく製造することができる。ここ

で、「GDH複合体」とは、好ましくは各サブユニットが会合して多量体タンパク質を形成しているものをいうが、遊離した各サブユニットの混合物も含まれる。

エシェリヒア属細菌の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

培地の栄養源としては、エシェリヒア属細菌の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ガラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は、エシェリヒア属細菌が生育し、GDH複合体を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDH複合体が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、GDH複合体を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

GDH複合体は、培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、GDH複合体が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、GDH複合体を含有する溶液とエシェリヒア属細菌菌体と分離した後に利用される。GDH複合体が菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して各サブユニットを可溶化し、水溶液として分離採取する。

上記のようにして得られたGDH複合体含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈

殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製されたGDH複合体を得ることができる。カラムクロマイトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。

尚、GDHは α サブユニット単独でも酵素活性を示す。したがって、本発明のエシェリヒア属細菌又はGDH複合体から、 α サブユニットのみを単離、精製して使用することもできる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例 1 ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH β サブユニットの検索

Sanger Centre のブルクホルデリア・セパシア J2315 株ゲノムデータベース (<http://www.sanger.ac.uk/>) を用いて、KS1 株由来 GDH の β サブユニット遺伝子を検索した。すでに明らかにされている KS1 株 GDH β サブユニットの N 末端配列（配列番号 5）を参考に、アセトバクター S p. 、グルコノバクター S p. 由来のアルコール脱水素酵素（Tamaki T. et al., *Biochim Biophys Acta* 1088(2):292-300 (1991)、Matsushita K., et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 304-310 (1992)、Takemura H., et al., *J Bacteriol.*, 175, 6857-66 (1993)、Kondo K. et al., *Appl Environ Microbiol.*, 63, 1131-8 (1997)）、エルビニア s.p. 、シュードモナス s.p. 由来のグルコン酸脱水素酵素（Yum DY, et al., *J Bacteriol.*, 179, 6566-72, (1997)、Matsushita K. et al., *J Biochem.*, 85, 1173-81 (1979)）、グルコノバイター s.p. 由来のソルビトール脱水素酵素（Choi, E.S., et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 125, 45-50 (1995)）、エルビニア s.p. 、パントエア s.p. 由来の 2-ケトグルコン酸脱水素酵素（Pujol CJ et al., *J Bacteriol.*,

182, 2230-7, (2000)) のチトクロムcサブユニットとホモロジーの高いアミノ酸配列（配列番号6）をデザインした。

上記アミノ酸配列を指標として、前記ブルクホルデリア・セパシアJ2315株のデーターベースからBLASTを用いてホモロジーの高いアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を検索した。つぎに、得られた5つの配列に対して、KS1株GDH α サブユニットのC末端配列とのホモロジーを検索した結果、2つの遺伝子断片から翻訳されるアミノ酸配列が高いホモロジー(>90%)を示した。各遺伝子断片は200~500bpと短かったので、これらの配列に対して相同性の高い配列を、Blas tを用いてブルクホルデリア・セパシアJ2315株のゲノムデーターベースから検索し、各断片をつなぎ合わせた。その結果、3110bpの断片を得た。得られた塩基配列にはGDHのC末端と思われるORFと1275bpからなるチトクロームc構造遺伝子と思われるORFが存在した。得られたJ2315株の塩基配列と既にクローニングされているKS1株 α サブユニット塩基配列を比較した結果、 α サブユニット下流にはJ2315株チトクロームcのシグナルペプチドをコードする塩基配列に相同性の高い塩基配列が含まれていた。

以上のことから、すでにクローニングされているブルクホルデリア・セパシアKS1株のGDH遺伝子（配列番号1、WO 02/36779号パンフレット参照）の三番目のORF（配列番号1の塩基番号2386以降）は、 β -サブユニットをコードしていると推定された。また、精製された β -サブユニットのN末端におけるアミノ酸配列と、配列番号1中の塩基番号2452~2466の塩基配列によって翻訳される5アミノ酸残基が一致したことからも、前記ORFは β サブユニットをコードしていると考えられた。

<2>インバースPCR法を用いた β サブユニット構造遺伝子の增幅

(1) 菌体の培養及びゲノムの抽出

KS1株を5mlの完全培地(0.5% polypepton、0.3% yeast extract、0.5% NaCl)を用いて37°Cで一晩振とう培養した。得られた菌体からGennomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いてゲノムを抽出した。方法は付属のマニュアルに従った。得られたゲノムに対してフ

エノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿させた後、精製水に溶解した。

(2) ゲノム断片の環状化

KS1株より抽出したゲノムを、BamHI、EcoRI、HindIII、SmaI、SacIおよびXbaIで消化し、エタノール沈殿によってゲノム断片を回収した。制限酵素消化したゲノム1μgをDNAライゲーションキット（宝酒造（株））を用いて16℃で一晩ライゲーション反応を行った。

(3) PCR

KS1株GDH β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたフォワードプライマー（EF1配列番号7）50pmol、リバースプライマー（ER1配列番号8）50pmol（プライマーはいずれもInvitrogen社に依託合成）、LA Taq（宝バイオ（株））0.5ml、dNTP溶液8μl、10×PCR buffer 5μlに精製水を全量50μlとなるように加え、プログラムテンプレートコントロールシステム PC-801（ASTEC）を用いてPCRを行った。PCRの反応は、以下の条件で行った。94℃ 5分、98℃ 20秒、62℃ 30秒を30サイクルの後、72℃ 6分、72℃ 10分。

SmaIで制限酵素消化したゲノムをテンプレートとした場合において、約2.1kbの大きさの断片がアガロース電気泳動で確認された。

<3>PCR增幅断片のシークエンシング

(1) TAクローニング

前記のインバースPCR産物をアガロースゲル電気泳動後、バンドを切り出し、Gene clean II KIT (Bio101 inc.) を用いて精製した。この断片を、pGEMR-T and pGEMR-T EASY Vector Systems (Promega) を用いて、pGEM-T Vectorにライゲーションした。ライゲーションを行ったベクターでエシェリヒア・コリDH5 α を形質転換し、アンピシリン 50μg/ml、X-Gal 40μg/ml、IPTG 0.1μMを含むL寒天培地を用いて一晩培養した。出現したコロニーから白色のコロニーを選択し、アンピシリン50μg/mlを含むL培地で一晩培養して、菌体からプラスドをアルカリ法により抽出した。

(2) シークエンスサンプルの調製

得られたプラスミドをRNase処理し、これに0.6倍量の20% PEG6000/2.5M NaClを加え、氷上に1時間放置した。その後15000r.p.m、4°Cで15分間遠心分離し、ペレットを得た。これを70%エタノールで洗浄し、ペレットを真空乾燥させた。これを精製水に溶解した。

(3) DNA塩基配列の解析

(2) で得られたプラスミドの挿入断片の塩基配列を、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)を用いて解析した。ベクターのマルチクローニングサイトからM13プライマーを用いて挿入断片の一部の配列を決定した結果、これまでに解析されている β サブユニットN末端を含む塩基配列が確認された。この配列を手がかりにプライマーを順次作製して用い、挿入断片の塩基配列を決定した。結果を配列番号9に示す。また、この塩基配列に含まれるORFがコードするアミノ酸配列を配列番号10に示す。

β サブユニットは、全部で425個のアミノ酸残基から構成されており、すでに得られているN末端アミノ酸配列と比較して、そのうち22残基はシグナルペプチドであると考えらる。アミノ酸配列から計算される分子量は45,276Daであり、シグナルペプチドを除いた分子量42,731Daは、SDS-PAGEから求められたKS1株GDH β サブユニットの分子量43kDaと同等の値であった。 β サブユニットのアミノ酸配列中には、チトクロームcにおいてヘムとの結合モチーフ(配列番号11)が3ヶ所に確認された。このORFは α サブユニット構造遺伝子のORFのすぐ下流に位置し、開始コドンの上流にSD配列と思われる配列が存在した。

得られたアミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のチトクロムcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のチトクロムcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedii*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のチトクロームcサブユニットと44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来2-ケトーグルコン酸脱水素酵素のチトクロームcサブユニットとアミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同意性を示していた。またこれらのチトクロームcのアミノ酸配列中には、ヘム結

合モチーフ（配列番号11）配列が保存されていた。

尚、KS1株のGDH β サブユニット構造遺伝子は、J2315株のGDH β サブユニット構造遺伝子と、塩基配列レベルで92.0%、アミノ酸レベルで92.2%の相同性を有している。

実施例2 エシェリヒア・コリへのGDH $\alpha\beta$ 遺伝子の導入及びc cm系の増強

<1>ブルクホルデリア・セバシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セバシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をTL液体倍地(ポリペプトン 10g、酵母抽出液 1g、NaCl 5g、KH₂PO₄ 2g、グルコース 5g；1L、pH 7.2)を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100μg/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のエノールークロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適定量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

<2>GDH $\alpha\beta$ 遺伝子の調製

前記染色体DNAを鋳型として、以下の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRにより、GDHのγサブユニット、αサブユニット及びβサブユニットをコードするDNA断片を增幅した。

<フォワードプライマー：cF1>

5'-CATGCCATGGCACACAAACGACAAACAC-3' (配列番号12)

<リバースプライマー：GDHbU1>

5'-GTCGACGATCTTCCAGCCAACATCAC-3' (配列番号13)

增幅した断片のC末端側を平滑末端化した後、N末端側をNcoIで消化し、同様に処理したpTrc99A (Pharmacia社)にライゲーションした。得られた組換えベクターでE. coli DH5 α を形質転換し、アンピシリン50μg/mLを含むLB寒天培地で生

じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養してプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約3.8kbの挿入断片が確認された。本プラスミドをpTrc99A $\gamma\alpha\beta$ と命名した。本プラスミド中のGDH $\alpha\beta$ 遺伝子は、trcプロモーターによって制御される。pTrc99A $\gamma\alpha\beta$ は、アンピシリン耐性遺伝子を保持している。

<3>c c m系プラスミドの調製

pTrc99A $\gamma\alpha\beta$ をEcoT22Iで消化した後に末端を平滑化した。次にNotIで消化して、アガロースゲル電気泳動により短いDNA断片を分離、回収した。このDNA断片をScaIとNotIで消化したpBBR122（MoBiTec社）に挿入して、pBBGDH $\gamma\alpha\beta$ を作製した。

E. coli JM109より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をLB培地（ポリペプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 10g；1L、pH7.0）を用いて37℃で一夜振盪培養した。増殖した菌体を遠心分離により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100μg/mlのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノールークロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくい取り、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、JM109染色体DNA溶液とした。

JM109染色体DNAを鋳型として、以下に配列を示すオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRによりc c m系遺伝子をコードするDNA断片を增幅した。

<フォワードプライマー：ECccmD1>

5' - TGGCCATGGTTGAAGCCAGAGAGTTACTTT -3' (配列番号14)

<リバースプライマー：ECccmU1>

5' - TTATTTACTCTCCTGCGGCGACAAATGTTG -3' (配列番号15)

増幅した末端を平滑化した後、N末端側をNcoIで消化した。この断片をACCIで消化、平滑末端化した後、NcoIで消化したpBBGDH $\gamma\alpha\beta$ とライゲーションしてpB

BJMccmを作製した。尚、pBBGDH $\gamma\alpha\beta$ をAccIで消化、平滑末端化した後、NcoIで消化することにより、GDH $\alpha\beta$ 遺伝子は削除されている。

<4>GDH $\alpha\beta$ 遺伝子及びc cm系のエシェリヒア・コリへの導入

E. coli JM109をpTrc99A $\gamma\alpha\beta$ 及びpBBJMccmで形質転換し、JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccmを得た。また、コントロールとしてpTrc99A $\gamma\alpha\beta$ でE. coli JM109を形質転換したJM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$ を得た。

これらの形質転換体を50 μ g/mlアンピシリンと50 μ g/mlカナマイシン (JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccm)、または50 μ g/mlアンピシリン (JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$) を含む10mLの2×YT培地で34°C、1夜振盪培養した。また、ブルクホルデリア・セパシアKS1株を10mLの完全培地で1夜振盪培養した。培養液の一部から遠心分離により各菌体を回収し、遠心分離前の液量になるように1%コール酸ナトリウムを含む10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を加えた後に超音波により細胞を破碎した。次に、破碎液を遠心分離した上清中のGDH活性を測定した。

GDH活性は次の操作にて測定した。47mM リン酸緩衝液pH6.0、20mM グルコース、2mMフェナジンメトサルフェート、0.1mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを、37°Cで予め加温した後にサンプルを加えて反応を開始し、37°Cに保ち、600nmの吸光度変化を測定して求めた。GDH活性は、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの分子吸光係数4.76mM/cmを用いて、酵素1単位 (U) は1分毎に1 μ モルの2,6-ジクロロフェノールインドフェノールが酸化される量と定義して求めた。

結果は、JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$ 、ブルクホルデリア・セパシアKS1、JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccmのGDH活性は、それぞれ、0.3U/mL、1.4U/mL、32U/mLであった。すなわち、JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$ にはGDH活性がほとんど認められず、野生株であるブルクホルデリア・セパシアKS1にはGDH活性がわずかであったが、JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccmでは非常に高いGDH活性が認められた。尚、JM109/pTrc99A $\gamma\alpha\beta$, pBBJMccmからGDH複合体を精製し、SDS-PAGEを行ったところ、KS1株から精製したGDH複合体と同様の泳動パターンを示すことが確認できた（図1）。

産業上の利用の可能性

本発明により、ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニットと β サブユニットを含む酵素複合体を、エシェリヒア属細菌で大量発現させることができる。

請求の範囲

1. ブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素の α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、ccm系の発現が増強されたエシェリヒア属細菌。
2. α サブユニットをコードするDNAが β サブユニットをコードするDNAの上流に位置し、単一のプロモーターによってそれぞれの発現が制御される請求項1に記載のエシェリヒア属細菌。
3. さらに、前記グルコース脱水素酵素の γ サブユニットをコードするDNAが発現可能な形態で導入された請求項1に記載のエシェリヒア属細菌。
4. γ サブユニットをコードするDNAが α サブユニットをコードするDNAの上流に位置する請求項3に記載のエシェリヒア属細菌。
5. 前記エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリである請求項1～4のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌。
6. 請求項1～5のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌を培養して、 α サブユニット及び β サブユニットのそれぞれをコードするDNAを発現させ、グルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

1/1

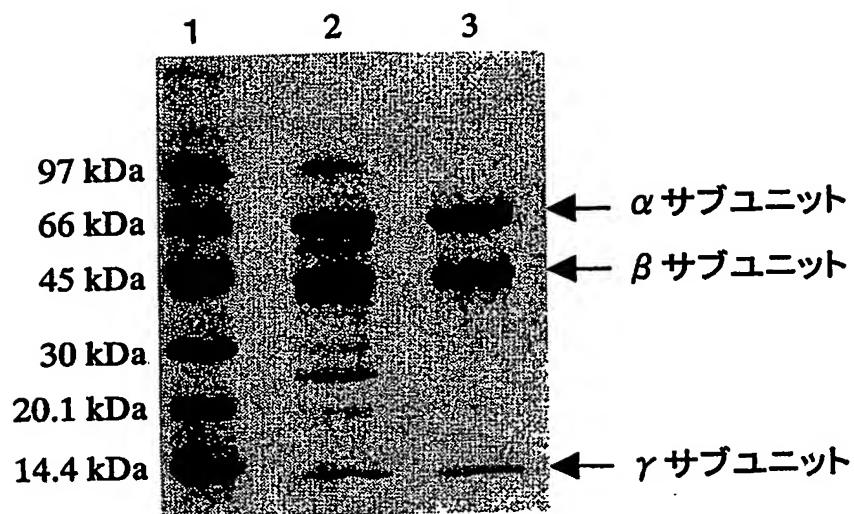


Fig. 1

SEQUENCE LISTING

<110> Arkay, Inc.
Unitika Ltd.

<120> Method for producing glucose dehydrogenase

<130> G843-OPC4051

<150> JP 2003-82739

<151> 2003-03-25

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258)..(761)

<220>

<221> CDS

<222> (764)..(2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386)..(2466)

<400> 1

aagctttctg ttgtattgca cgcgattcta accgagcgic tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120
tacgaatggc tgacacatgt aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180
tacatttcag gtccgcgcgg atttttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccgg 240
gttgcagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc 290
Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg

1 5 10

cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338
His Gly Asp Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln

15 20 25

ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg	386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu	
30 35 40	
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg	434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met	
45 50 55	
acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc	482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile	
60 65 70 75	
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc	530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala	
80 85 90	
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg	578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr	
95 100 105	
cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc	626
Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu	
110 115 120	
ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc	674
Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe	
125 130 135	
ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa	722
Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys	
140 145 150 155	
ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gca tg atg gcc	769
Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala	
160 165 170	
gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc	817
Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val	
175 180 185	
gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg	865
Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val	
190 195 200	
atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag	913
Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu	
205 210 215	
cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg	961
Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro	
220 225 230	
tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac	1009
Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr	
235 240 245 250	
ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg	1057

Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala			
255	260	265	
gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att			1105
Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile			
270	275	280	
ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg			1153
Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp			
285	290	295	
ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa			1201
Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu			
300	305	310	
gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg			1249
Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro			
315	320	325	330
ccg aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag			1297
Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu			
335	340	345	
cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc			1345
Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val			
350	355	360	
gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg			1393
Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro			
365	370	375	
act tgt tgc ggc aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg			1441
Thr Cys Cys Gly Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala			
380	385	390	
atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg			1489
Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala			
395	400	405	410
aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac			1537
Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp			
415	420	425	
aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat			1585
Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His			
430	435	440	
ccg gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg			1633
Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr			
445	450	455	
ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc			1681
Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val			
460	465	470	
gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc			1729
Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly			

475	480	485	490	
acc ggc gtg tcg ttc tat	gct gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc			1777
Thr Gly Val Ser Phe Tyr	Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly			.
495	500	505		
ccg cag gag atg acg tcg	ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc			1825
Pro Gln Glu Met Thr Ser	Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg			
510	515	520		
gct acc gaa gct gct aag	aag atc cac ctg aac ctg tcg cgc atc			1873
Ala Thr Glu Ala Ala Lys	Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile			
525	530	535		
gac cag gag acg cag aag	atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc			1921
Asp Gln Glu Thr Gln Lys	Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro			
540	545	550		
gac gag ctc gac gct cag	atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag			1969
Asp Glu Leu Asp Ala Gln	Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln			
555	560	565	570	
ttc gac tgc ttc cac gaa	atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg			2017
Phe Asp Cys Phe His Glu	Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val			
575	580	585		
ccg agc aag acg gct acc	gat gct atc ggc att ccg cgc ccc gag atc			2065
Pro Ser Lys Thr Ala Thr	Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile			
590	595	600		
acg tat gct atc gac gac	tac gtg aag cgc ggc gcc gct cat acg cgc			2113
Thr Tyr Ala Ile Asp Asp	Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg			
605	610	615		
gag gtc tac gct acc gct	gct aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg			2161
Glu Val Tyr Ala Thr Ala	Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val			
620	625	630		
ttc aac gac gaa ttc gct	ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc			2209
Phe Asn Asp Glu Phe Ala	Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile			
635	640	645	650	
atg ggc gcc gat gct cgc	gac tcc gtc gac aag gac tgc cgc acg			2257
Met Gly Ala Asp Ala Arg	Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr			
655	660	665		
ttc gac cat ccg aac ctg	ttc att tcg acg acg gct acg atg ccg acc			2305
Phe Asp His Pro Asn Leu	Phe Ile Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr			
670	675	680		
gtc ggt acc gta aac gtg	acg ctg acg atc gcc gct ctc gct cgg			2353
Val Gly Thr Val Asn Val	Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg			
685	690	695		
atg tcg gac acg ctg aag	aag gaa gtc tgacc gtg cggttaaa tct act ctc			2403
Met Ser Asp Thr Leu Lys	Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu			
700	705	710		

5/13

act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
715 720 725
gcc gat gcg gcc gat c 2467
Ala Asp Ala Ala Asp
730

<210> 2
<211> 168
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 2
Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala
1 5 10 15
Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu
20 25 30
Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp
35 40 45
Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser
50 55 60
Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu
65 70 75 80
Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln
85 90 95
Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser
100 105 110
Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn
115 120 125
Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp
130 135 140
Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala
145 150 155 160
Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala
165

<210> 3
<211> 539
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 3
Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
1 5 10 15

Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
20 25 30
Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
35 40 45
Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
50 55 60
Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
65 70 75 80
Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
85 90 95
Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
100 105 110
Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
115 120 125
Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
130 135 140
Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
145 150 155 160
Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
165 170 175
Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
180 185 190
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
195 200 205
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
210 215 220
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
225 230 235 240
Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
245 250 255
Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
260 265 270
Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
275 280 285
Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
290 295 300
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
305 310 315 320
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
325 330 335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
340 345 350
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser

7/13

355	360	365
Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met		
370	375	380
Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr		
385	390	395
400		
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg		
405	410	415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro		
420	425	430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His		
435	440	445
Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp		
450	455	460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser		
465	470	475
480		
Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys		
485	490	495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met		
500	505	510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala		
515	520	525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val		
530	535	

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu			
1	5	10	15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp			
20	25		

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 5

Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala			
1	5	10	15

<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:consensus

<220>
<221> UNSURE
<222> (6, 17, 18, 19, 22)
<223> Xaa=unknown

<400> 6
Ala Asp Ala Ala Asp Xaa Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Asp Cys Xaa Ala Cys His
20 25

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7
tgcaccgtgc ggaaatctac tctcact 27

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
acttccttct tcagcggtgc cgacatc 27

<210> 9

<211> 1441

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(1398)

<400> 9

tccgaacctg	ttcatttcga	gcagcgac	gatgccgacc	gtcggtaccc	taaacgtgac	60
gctgacgatc	gccgcgtcg	cgctgcggat	gtcggacacg	ctgaagaagg	aagtctgacc	120
gtg cgg aaa	tct act ctc	act ttc ctc	atc gcc ggc	tgc ctc	gctg itg	168
Val Arg Lys Ser	Thr Leu Thr	Phe Leu Ile	Ala Gly Cys	Leu Ala	Leu	
1	5	10	15			
ccg ggc ttc	gctc gcg	gcc gct	gat gct	ccg gct	ctg gtc	216
Pro Gly Phe	Ala Arg Ala	Ala Asp Ala	Ala Asp Pro	Ala Leu	Val Lys	
20	25	30				
cgc ggc gaa	tac ctc	gctc acc	gcc atg	ccg gta	ccg atg	264
Arg Gly Glu	Tyr Leu Ala	Thr Ala Met	Pro Val	Pro Met	Leu Gly	
85	40	45				
atc tac acg	agc aac	atc acg	ccc gat	ccg gat	acg ggc	312
Ile Tyr Thr	Ser Asn Ile	Thr Pro Asp	Pro Asp Thr	Gly Asp	Cys Met	
50	55	60				
gcc tgc cac	acc gtg aag	ggc ggc aag	ccg tac	gctc ggc	ggc ctg ggc	360
Ala Cys His	Thr Val Lys	Gly Lys Pro	Tyr Ala	Gly Gly	Leu Gly	
65	70	75	80			
ggc atc ggc	aaa tgg acg	ttc gag gac	ttc gag	ccg gct	gtg cgg cac	408
Gly Ile	Gly Lys Trp	Thr Phe	Glu Asp	Phe Glu	Arg Ala Val	
85	90	95				
ggc gtg tcg	aag aac	ggc gac	aac ctg	tat ccg	gctg atg	456
Gly Val	Ser Asn	Gly Asp	Asn Leu	Tyr Pro	Ala Met	
100	105	110				
tcg tac gcg	aag atc	aag gac	gac gac	gta cgc	gctg tac	504
Ser Tyr	Ala Lys	Ile Lys	Asp Asp	Asp Val	Arg Ala	
115	120	125				
ttc atg cac	ggc gtc	gag ccg	gtc aag	cag gct	ccg ccg	552
Phe Met His	Gly Val	Glu Pro	Val Lys	Gln Ala	Pro Pro	
130	135	140				
atc cca	gctg cta	agc atg	cgcc tgg	ccg ctg	aag atc	600
Ile Pro	Ala Leu	Leu Ser	Met Arg	Trp Pro	Leu Lys	
145	150	155	160			
ctg ttc	ctg aag	gac ggc	ccg tac	cag ccg	aag ccg	648
Leu Phe	Leu Lys	Asp Gly	Pro Tyr	Gln Pro	Lys Pro	
				Ser Gln	Ala	

10/13

165	170	175	
gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc			696
Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser			
180	185	190	
acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac			744
Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp			
195	200	205	
gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac			792
Glu Thr Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp			
210	215	220	
ggc tac aac atc acg tcg gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg			840
Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr			
225	230	235	240
cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc			888
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val			
245	250	255	
gcg cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg			936
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser			
260	265	270	
aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg			984
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr			
275	280	285	
gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg			1032
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp			
290	295	300	
ggc aag ccg gcc gag gac ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg			1080
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala			
305	310	315	320
tcg tcg ggc atc gat ccg gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg			1128
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr			
325	330	335	
tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tcg			1176
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser			
340	345	350	
ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tcg aat ccg tcg aac ctc gtg			1224
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val			
355	360	365	
cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc			1272
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile			
370	375	380	
ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac ggc cag atc gcc gcg			1320
Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala			
385	390	395	400

11/13

ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgccgcccaca 1418
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425
 cggcgcacc gataggacag gag 1441

<210> 10
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 10
 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30
 Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
 50 55 60
 Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
 85 90 95
 Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
 100 105 110
 Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
 115 120 125
 Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
 165 170 175
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190
 Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
 195 200 205
 Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr

12/13

225	230	235	240
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val			
245	250	255	
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser			
260	265	270	
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr			
275	280	285	
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp			
290	295	300	
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala			
305	310	315	320
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr			
325	330	335	
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser			
340	345	350	
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val			
355	360	365	
Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile			
370	375	380	
Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala			
385	390	395	400
Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val			
405	410	415	
Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg			
420	425		

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heme binding motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (2, 3)

<223> Xaa=unknown

<400> 11

Cys Xaa Xaa Cys His

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
catgccatgg cacacaacga caacac . 26

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
gtcgcacgatc ttcttccagc cgaacatcac . 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
tggccatgg t gaaaggcaga gagttacitt 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15
ttatattactc tcctgcggcg acaaaatgttg 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N1/21, C12N9/04, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N1/21, C12N9/04, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y1	WO 02/36779 A (Koji SODE), 10 May, 2002 (10.05.02), & AU 1099102 A & CA 2427031 A & EP 1331272 A	1-6
Y1	INOSE, K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli. Biochim.Biophys.Acta., 21 February, 2003 (21.02.03), Vol.1645(2), pages 133 to 138	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 April, 2004 (16.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004074

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y2	REINCKE, B. et al., Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome c552 acting as electron donor to the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase. Biochim. Biophys. Acta., 21 April, 1999 (21.04.99), Vol.1411(1), pages 114 to 120	1-6
Y2	HERBAUD, ML. et al., Escherichia coli is able to produce heterologous tetraheme cytochrome c(3) when the ccm genes are co-expressed, Biochim.Biophys.Acta., 31 August, 2000 (31.08.00), Vol.1481(1), pages 18 to 24	1-6
P,Y	JP 2003-274964 A (Koji SODE), 30 September, 2003 (30.09.03), (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1.7 C12N 1/21, C12N 9/04, C12N 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1.7 C12N 1/21, C12N 9/04, C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y1	WO 02/36779 A(早出広司)2002.05.10 & AU 1099102 A & CA 2427031 A & EP 1331272 A	1-6
Y1	INOSE, K et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta. 2003 Feb 21, vol. 1645(2), pp. 133-138	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

長井 啓子

4N 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y2	REINCKE, B et al., Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome c552 acting as electron donor to the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase. Biochim Biophys Acta. 1999 Apr 21, vol. 1411(1), pp. 114-120	1-6
Y2	HERBAUD, ML et al., Escherichia coli is able to produce heterologous tetraheme cytochrome c(3) when the ccm genes are co-expressed. Biochim Biophys Acta. 2000 Aug 31, vol. 1481(1), p. 18-24	1-6
PY	JP 2003-274964 A(早出広司)2003.09.30 (ファミリーなし)	1-6